

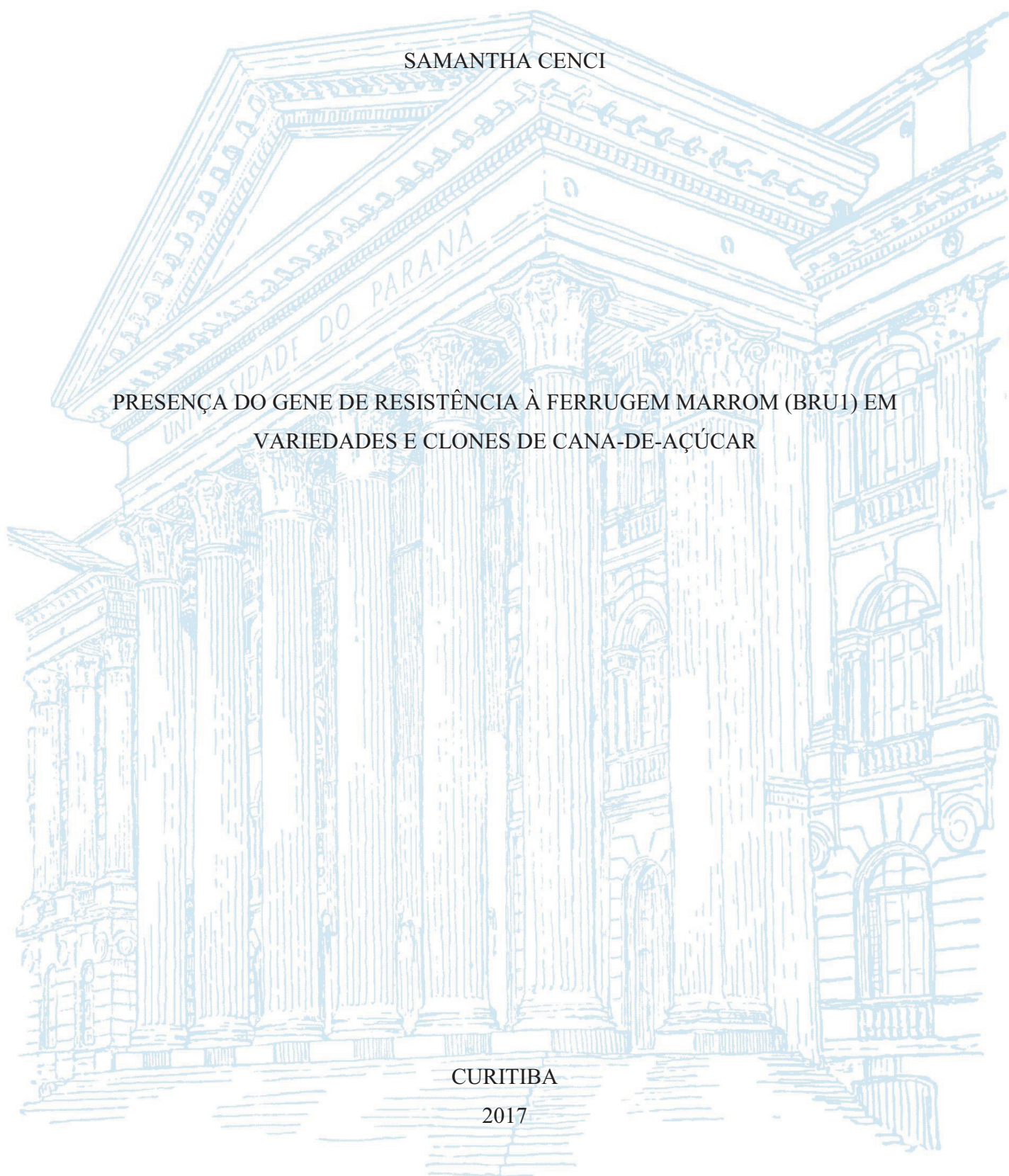
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SAMANTHA CENCI

PRESENÇA DO GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM MARROM (BRU1) EM
VARIEDADES E CLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR

CURITIBA

2017



SAMANTHA CENCI

PRESENÇA DO GENE DE RESISTÊNCIA Á FERRUGEM MARROM (BRU1) EM
VARIEDADES E CLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho.

Co-orientadora: Profa. Dra. Lucimeris Ruaro.

CURITIBA
2017

Cenci, Samantha
SA237p Presença do gene de resistência à ferrugem marrom (BRU1)
em variedades e clones de cana-de-açúcar / Samantha Cenci
Jaronski dos Santos. - Curitiba, 2017.
49 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia - (Produção Vegetal).
Orientador: João Carlos Besspalhok Filho
Coorientadora: Lucimeris Ruaro

1. Puccinia. 2. Cana-de-açúcar - Doenças e pragas. 3. Cana-
de-açúcar - Variedades. 4. Fungos da ferrugem. I. Besspalhok
Filho, João Carlos. II. Ruaro, Lucimeris. III. Título. IV.
Universidade Federal do Paraná.

CDU 633.61



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

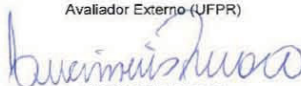
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de SAMANTHA CENCI intitulada: **PRESENÇA DO GENE DE RESISTÊNCIA A FERRUGEM MARROM (BRU1) EM VARIEDADES E CLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Agosto de 2017.


JOÃO CARLOS BESPALKOK FILHO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


BRUNO PORTELA BRASILEIRO
Avaliador Externo (UFPR)


LUCIMERIS RUARO
Avaliador Externo (UFPR)

À minha família,
Ao meu marido Mauricio e minha filha Rafaela,
Pelo amor e apoio em todos os momentos.
Dedico

AGRADECIMENTOS

A minha família pela união e amor infinito.

À Deus, por sempre guiar meus passos e minhas escolhas.

Aos meus pais, Gilmar e Neusa por acreditarem em mim, por me ensinarem o valor do conhecimento e por me incentivarem a continuar lutando sem nunca desistir e, ainda, por sentirem orgulho da minha trajetória de vida pessoal e acadêmica.

A minha filha Rafaela, que mesmo tão pequena, me incentiva a ser uma pessoa melhor e a querer fazer a diferença todos os dias onde quer que estejamos.

Ao meu marido Mauricio, pelo amor e paciência comigo nos momentos tão estressantes de nossas vidas. Sou grata pela companhia no dia no laboratório e por ficar comigo de madrugada acordado como forma de incentivo para que eu prosseguisse nesta jornada de escrita.

Ao meu irmão Eduardo, que me cobrava exemplo por eu ser a irmã mais velha, e isso me incentivava a continuar na labuta da pesquisa.

A minha sogra Sandra pelo apoio e conselhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho, por ter me aceitado como orientanda mesmo não me conhecendo. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos a mim e pelas ajudas nos momentos de dificuldade desta trajetória.

A minha co-orientadora, Prof. Dra. Lucimeris Ruaro, pela amizade e conselhos. Pelo trabalho desenvolvido em Paranavaí, avaliando e conduzindo meu experimento, inclusive quando eu não pude estar presente.

A todos os professores da pós-graduação, em especial o Prof. Dr. Ricardo Augusto de Oliveira pelo auxílio na escolha das cultivares e na minha ida a Paranavaí, contribuindo para a execução desta pesquisa.

Aos meus amigos, Tales Romano e Mariana Franca e Guilherme Figueiredo pelo companheirismo de todas as formas, até nas risadas mesmo quando as coisas não davam certo.

À secretaria do programa de pós-graduação, pela disposição e auxílio de sempre.

Aos funcionários da Estação Experimental de Paranavaí, da Universidade Federal do Paraná. Em Especial ao Eng. Agrônomo Guilherme Souza Berton, pela disposição em coletar e mandar o material necessário à análise para Curitiba, assim como toda a ajuda por email e mensagens, bem como pela condução do experimento.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e da licença maternidade.

À FUNPAR pelo auxílio financeiro para a viagem a Paranavaí e recursos para as análises.

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Produção Vegetal pela oportunidade de realização do Mestrado.

E a todos que, de alguma maneira presencial ou à distância, contribuíram para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

“...tudo posso naquele que me fortalece”. (Filipenses 4.13)

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. L.) destaca-se como um dos principais cultivos no mundo. Vários fatores podem limitar a produtividade da cultura, dentre os quais a ocorrência de doenças como a ferrugem marrom causada pelo fungo *Puccinia melanocephala* tem destaque, podendo causar perdas de até 50% em variedades suscetíveis. O uso de variedades resistentes é o método de controle mais efetivo. Um gene de efeito maior, Bru1, já foi identificado como responsável pela resistência à ferrugem marrom, e dois marcadores moleculares (R12H16 e 9O20-F4) já foram previamente relatados como fortemente associados a esse gene. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi: identificar a presença do gene Bru1 nas variedades de cana-de-açúcar mais plantadas no Brasil e alguns clones de interesse do Programa de Melhoramento Genético da UFPR. Para isso, foram utilizadas 24 variedades e clones promissores (CTC, SP e RB), entre as quais 14 desenvolvidas pela RIDESA, que estão entre as mais plantadas no Brasil. Como controle positivo foi utilizada a variedade R570 e como controle negativo foi utilizada a variedade NA56-79. Foi extraído o DNA total dos 24 genótipos e em seguida foi realizada amplificação com os marcadores moleculares R12H16 e 9O20-F4. A associação da presença do gene Bru1 com a resistência à ferrugem marrom foi feita baseada em informações bibliográficas a respeito da resistência/suscetibilidade da doença das variedades em estudo. A presença do Bru1 foi detectada em 20 das 24 variedades/clones promissores analisados, ou seja, estando presente 83,4% dos genótipos. A associação do gene Bru1 com os genótipos desse estudo foi de 100 %, estando ele presente em todas os genótipos resistentes e, portanto, completamente associado à resistência à ferrugem marrom nas variedades aqui estudadas. Pode-se concluir que os marcadores R12H16 e 9O20-F4 são altamente eficientes em prever fenótipos resistentes, e que o gene de resistência Bru1 é provavelmente a principal causa de resistência à ferrugem marrom nos campos comerciais de cana-de-açúcar do Brasil.

Palavras-chave: *Puccinia melanocephala*. *Saccharum* spp. Seleção assistida por marcadores (SAM). R12H16. 9O20-F4.

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* spp. L.) is one of the main crops in the world. Several factors may limit crop productivity, among which the occurrence of diseases such as brown rust caused by the fungus *Puccinia melanocephala* is highlighted and may cause losses of up to 50% in susceptible varieties, therefore, the use of resistant cultivars is the more effective control. A larger effect gene, Bru1, has already been identified as responsible for resistance to brown rust and two molecular markers (R12H16 and 9O20-F4) have previously been reported as strongly associated with this gene. In this sense, the objective of this study was: to identify the presence of the Bru1 gene in the varieties most planted in Brazil and some of interest in the UFPR Breeding Program. For this, 24 varieties (CTC, SP and RB) were used, among which 14 developed by RIDESA, which are among the most planted in Brazil. For the positive control the variety R570 was used and for the susceptible control the variety NA56-79. The DNA of the 24 varieties was extracted followed by amplification with the molecular markers R12H16 E 9O20-F4. The association of the presence of the Bru1 gene and the resistance to brown rust was based on bibliographical information, regarding the resistance / susceptibility of the disease of the varieties under study. The presence of Bru1 was detected in 20 of the 24 genotypes analyzed, in other words it was present in 83.4% of the genotypes. The association of the Bru1 gene with the varieties of this study was 100%, being completely associated to brown rust resistance in the varieties. It can be concluded that the R12H16 and 9O20-F4 markers are highly efficient in predicting resistance to brown rust, and that the Bru1 resistance gene is probably the main source of resistance to brown rust in commercial fields of sugarcane in Brazil.

Palavras-chave: *Puccinia melanocephala*. *Saccharum* spp., Marker- assisted selection (MAS). R12H16. 9O20-F4.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR AVALIADAS QUANTO A PRESENÇA DO GENE BRU1 E SEUS RESPECTIVOS GENITORES. 31

TABELA 2: QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE BRU1 EM NANODROP ND-2000C (THERMOSCIENTIFIC). 36

TABELA 3: GENOTIPAGEM DAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRESENÇA (+) OU AUSÊNCIA (-) DOS MARCADORES R12H16 E 9020-F4 E O FENÓTIPO DE ACORDO COM A LITERATURA QUANTO À RESISTÊNCIA (R) OU SUSCETIBILIDADE (S) A FERRUGEM MARROM. 39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: SINTOMAS DE FERRUGEM MARROM EM CANA-DE-AÇÚCAR. FONTE: VSISUGAR.COM, 2016.	23
FIGURA 2: GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO A QUALIDADE DA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS 24 VARIEDADES DE CANA-DE- AÇÚCAR UTILIZADAS PARA AVALIAR A PRESENÇA DO BRU1.....	35
FIGURA 3: PRESENÇA DO GENE BRU1 EM VARIEDADES E CLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDOS À GENOTIPAGEM COM MARCADORES MOLECULARES QUE FLANQUEIAM O GENE BRU1.	37
FIGURA 4: GEL DE AGAROSE 2% MOSTRANDO A AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR UTILIZANDO OS PARES DE PRIMERS R12H16.	38
FIGURA 5: GEL DE AGAROSE 3% MOSTRANDO A AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR UTILIZANDO OS PARES DE “PRIMERS” 9020-F4 APÓS DIGESTÃO COM ENZIMA RSAI.....	40

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1.	A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	16
2.1.1	ASPECTOS GERAIS.....	16
2.1.2	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CANA-DE-AÇÚCAR	17
2.1.3	MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	18
2.2.	DOENÇAS NA CANA-DE-AÇÚCAR.....	19
2.3.	FERRUGEM MARROM	21
2.3.1	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E HISTÓRICA DA DOENÇA.....	21
2.3.2	SINTOMATOLOGIA E ETIOLOGIA DA DOENÇA.....	22
2.3.3	MELHORAMENTO GENÉTICO E A FERRUGEM	24
2.4.	RESISTÊNCIA DE PLANTAS E VARIABILIDADE DE <i>Puccinia melanocephala</i>	26
2.4.1	HERANÇA DA RESISTÊNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR À FERRUGEM MARROM.....	27
2.5.	O USO DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1.	GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADOS.....	31
3.2.	EXTRAÇÃO, QUALIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA	32
3.3.	AMPLIFICAÇÃO COM OS PARES DE PRIMERS R12H16 E 9020-F4.....	33
3.4.	VISUALIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE 570 PB E 200 PB.....	34
3.5.	AGRUPAMENTO DAS VARIEDADES QUANTO À SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA À <i>Puccinia melanocephala</i>	34
4.	RESULTADOS	35
4.1.	QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA	35
4.2.	FREQUÊNCIA DO GENE BRU 1 NAS VARIEDADES.....	36
5.	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. L.) destaca-se como um dos principais cultivos na agricultura brasileira. O país é o maior produtor mundial da cultura, tendo produzido 657,1 milhões de toneladas na safra 2015/2016 (CONAB, 2016).

Levando em consideração o atual cenário da produção brasileira de cana-de-açúcar é importante que o país mantenha as altas produtividades, porém vários fatores podem limitar a produtividade da cultura. Dentre os quais destacam-se a ocorrência de doenças como as ferrugens (GIGLIOTI *et al.*, 2009).

A ferrugem marrom causada pelo fungo *Puccinia melanocephala* Syd e P.Syd (1907) é considerada uma das doenças mais importantes no cultivo de cana-de-açúcar devido à ampla distribuição geográfica e aos danos causados. Essa doença provoca lesões no tecido foliar e, conseqüentemente, interferindo no processo fotossintético da planta, a qual tem seu crescimento e produção prejudicados (MATSUOKA *et al.*, 1999; TOKESHI e RAGO, 2005).

A principal forma de controle da doença é o uso de variedades resistentes. Diante disso, diversos estudos sobre a resistência à ferrugem marrom vêm sendo conduzidos. A variedade R570 tem-se mostrado resistente à ferrugem em diversas regiões do mundo e a partir dela diversos estudos buscando o entendimento da resistência a ferrugem marrom foram iniciados (COSTET *et al.*, 2012).

A característica de resistência à ferrugem marrom é um fator de alta herdabilidade (SORDI *et al.*, 1988; HOGARTH *et al.*, 1993). Diante disso através de mapeamentos e análises de QTL (Quantitative Trait Loci) foi confirmada a presença de um gene com efeito maior de caráter dominante, denominado Bru1 (DAUGROUIS *et al.*, 1996; RAMDOYAL *et al.*, 1996). E com isso foram desenvolvidos dois marcadores, R12H16 e 9020-F4, os quais estão fortemente ligados um ao outro e que podem funcionar como marcador diagnóstico para o gene Bru1 (COSTET *et al.*, 2012). Diversos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar ao redor do mundo utilizaram esses marcadores para determinar a frequência do gene Bru1 e validar a eficiência dos mesmos como marcador de diagnóstico de resistência à ferrugem marrom

(GLYNN *et al.*, 2012; RACEDO *et al.*, 2013; PARCO *et al.*, 2014; NEUBER *et al.*, 2017).

Recentemente Neuber *et al.* (2017) em estudo no Brasil com acessos exóticos de cana-de-açúcar e diversas variedades, verificou a presença do gene Bru1 em 75,21% das variedades sendo que todas as variedades classificadas como resistentes possuem o gene Bru1. Também no Brasil, Barreto *et al.* (2017) verificou a presença do gene Bru1 em 12 de 14 variedades da Ridesa estudadas as quais estão entre as mais plantadas no Brasil.

O desenvolvimento de variedades resistentes é um processo longo e trabalhoso. Nesse sentido, uma alternativa para facilitar o processo é a união das técnicas convencionais e o uso de marcadores moleculares (BORÉM e MIRANDA, 2005). O uso de marcadores moleculares tem sido de grande importância na avaliação de variações genéticas, sendo um meio eficiente de associar variação fenotípica e genotípica (VARSHNEY *et al.*, 2005; KALIA *et al.*, 2011), contribuindo também na identificação e caracterização de genótipos resistentes a doenças (SIMCOX e BENNETZEN, 1993; BRUNELLI *et al.*, 2002).

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi: identificar a presença do gene Bru1 nas variedades de cana-de-açúcar mais plantadas no Brasil e em clones promissores de interesse do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar da UFPR.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR

2.1.1 Aspectos gerais

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, poliploide, C4, que possui capacidade de armazenar grandes quantidades de sacarose em seu colmo. A sacarose é processada e convertida em diferentes tipos de açúcares e matérias-primas voltadas tanto às indústrias alimentícias e de bebidas, quanto às de etanol combustível (NEVES e CONEJERO, 2010).

A cana-de-açúcar pertence à tribo Andropogoneae, família Poaceae, gênero *Saccharum*. Nessa tribo encontram-se outras gramíneas como o sorgo e o milho. O gênero *Saccharum* compreende 6 espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. edule*, *S. robustum*, *S. barberi* e *S. sinense* (D'HONT et al., 1996). A cana-de-açúcar tem como centro de diversidade, o continente asiático, porém seu exato centro de origem é desconhecido. Vários autores têm reportado possíveis locais, estando a Índia, Indonésia, Papua, Nova Guiné, China e ilhas da Polinésia entre os mais citados (MUKHERJEE, 1957).

As variedades atuais (*Saccharum* spp.) são provenientes da hibridação interespecífica envolvendo principalmente as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum* (PANGE e BABU, 1960; PRICE, 1963).

As plantas de *S. spontaneum* possuem alto teor de fibra, perfilhamento intenso, sistema radicular bem desenvolvido e respondem satisfatoriamente a ação de patógenos, todavia apresentam colmos baixos e finos com reduzido teor de sacarose. As plantas de *S. officinarum* tem colmos grossos com pouca fibra e elevado teor de sacarose, por causa dessas características são denominadas de “canas nobres”. No entanto, possuem um sistema radicular pouco desenvolvido e suscetibilidade a patógenos. Por isso, foi realizado o cruzamento dessas duas espécies, na tentativa de unir as características de

interesse agrônomo, nomeamos esse processo de nobilitação (CESNIK e MIOCQUE, 2004).

A espécie *S. spontaneum* apresenta elevada variação fenotípica e ampla adaptabilidade, podendo ser encontrada em diversas regiões da África, Europa Oriental e grande parte da Ásia. A espécie *S. officinarum* pode ser encontrada apenas em jardins varietais, pois não há registro de sua ocorrência na natureza, e acredita-se que tenha sido selecionada pelo homem de formas mutantes de *S. robustum* ($x=10$, $2n = 6x = 60$), espécie predominante na Nova Guiné (STEVENSON, 1965).

O genoma da cana-de-açúcar é um dos mais complexos entre as plantas cultivadas. O alto nível de poliploidia e a ocorrência de aneuploidia representam um desafio para os programas de pesquisa em genética e melhoramento (GRIVET E ARRUDA, 2001).

A participação de *S. spontaneum* (10 a 20%) na composição genômica da cana-de-açúcar é menor quando comparada com *S. officinarum* (80%). Contudo, estudos têm mostrado que a espécie *S. spontaneum* é a principal responsável pela diversidade encontrada nas variedades atuais (PIPERIDIS *et al.*, 2008).

2.1.2 Importância econômica da cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. O país produziu 657,1 milhões de toneladas na safra 2015/2016 (CONAB, 2016).

Os principais estados produtores do Brasil são São Paulo (4,51 milhões de hectares), Goiás (0,82 milhões de hectares), Minas Gerais (0,78 milhões de hectares), e o Paraná (0,62 milhões de hectares), que totalizam 75,5% da área plantada com cana-de-açúcar no país (CONAB, 2016).

Mesmo sendo o maior produtor mundial, o Brasil enfrenta grandes dificuldades econômicas e políticas na produção sucroalcooleira. O PRÓALCOOL, Programa Nacional do Alcool, criado em 1975/1976, teve seu auge no ano de 1985, quando 96%

da frota brasileira de automóveis era movida a álcool. As safras entre os anos de 1991 a 1996 permitiram que a produção de etanol atingisse 12,3 bilhões de litros, mas, posteriormente, o programa foi abandonado fazendo com que a produção de etanol e o incentivo ao cultivo da cana-de-açúcar declinassem consideravelmente (BNDES, 2008).

Atualmente há outros usos para a cultura da cana-de-açúcar como o uso do bagaço, subproduto da moagem dos colmos, que pode ser utilizado não apenas na alimentação animal, mas também como fonte de energia renovável e no aquecimento de caldeiras. Pode ainda ser utilizado como fonte de celulose e de fibra, como matéria-prima para madeira composta e na síntese de fibras de carbono. As cinzas, resultantes da queima do bagaço, têm sido utilizadas nas usinas como adubo. A vinhaça, subproduto da produção de etanol, é utilizada para irrigar canaviais funcionando como importante fonte de matéria orgânica e de nutrientes inorgânicos (BNDES, 2008; SILVA e MORAIS, 2008).

As preocupações relacionadas ao aquecimento global e desenvolvimento sustentável também têm orientado pesquisas que visam unir a utilização de “subprodutos” do processo de produção à geração de energia. O bagaço e a palha de cana-de-açúcar, por exemplo, podem ser queimados nas caldeiras das usinas sucroalcooleiras, produzindo vapor que move turbinas e gera energia elétrica. Estima-se que em 2020 esses componentes serão responsáveis por 15.2 GW, 15% da demanda doméstica (RIPOLI e RIPOLI, 2008; NEVES e CONEJERO, 2010). Além disso, é promissor o desenvolvimento de bioplásticos, derivados do álcool ou açúcar (NEVES e CONEJERO, 2010).

2.1.3 Melhoramento genético da cana-de-açúcar

O melhoramento genético surgiu, provavelmente, junto com o início da agricultura há mais ou menos 10.000 anos atrás. Desde os primórdios o homem busca plantas superiores, com maior produtividade e resistência às doenças. A domesticação e o melhoramento das espécies durante os séculos moldaram a composição genética das culturas atuais. Essa estruturação do germoplasma adquirida ao longo do tempo é a principal ferramenta utilizada pelos atuais melhoristas nos programas de melhoramento genético de plantas (BORÉM et al., 2005).

As primeiras pesquisas no país com o melhoramento genético da cana-de-açúcar se concentravam principalmente em quatro núcleos: (1) Estação de Escada, em Pernambuco (1913); (2) Estação de Campos, no Rio de Janeiro (1916); (3) Estação Geral de experimentação de Barreiros, em Pernambuco (1920) e (4) Escola Superior de Agricultura de São Bento, em Tabera, Pernambuco (data incerta). Esses centros de pesquisa trouxeram valiosas contribuições à canavicultura brasileira, estabelecendo normas, difundindo tecnologias, promovendo intercâmbios e possibilitando a substituição de variedades. Contribuições que evitaram o colapso da cultura na década de 30, depois que as plantações de cana-de-açúcar foram dizimadas pelo vírus do mosaico (MATSUOKA *et al.*, 1999).

Além das contribuições acima citadas, os centros pioneiros em estudos com cana-de-açúcar serviram como base para o surgimento de outros programas de melhoramento genético no país, como: o programa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR – atual RIDESA), o programa de melhoramento da COPERSUCAR, atual CTC (GOES *et al.*, 2009).

Em 1990, surge a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), que assumiu todo o patrimônio físico e de recursos humanos do antigo PLANALSUCAR. Após vinte anos de sua criação, a RIDESA é conhecida nacional e internacionalmente como líder no desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar. Conta com um banco de germoplasma composto por mais de 2.500 genótipos e variedades liberadas com aptidões para todo o Brasil (RIDESA, 2010).

O bom desempenho de cultivares de cana-de-açúcar é essencial a todas as cadeias produtivas do setor sucroalcooleiro. Assim, é necessário o desenvolvimento contínuo de novas variedades que beneficiem os produtores e que atendam às exigências do mercado; características que constituem objetivos de programas de melhoramento genético (BRESSIANI, 2001; PALHARES, 2012).

A variabilidade genética disponível para seleção é obtida por meio do cruzamento entre os genitores de interesse. Para isso, é necessário promover o

florescimento dos mesmos assim como o seu sincronismo. Muitos são os fatores que influenciam o florescimento da cana-de-açúcar, destacando-se o fotoperíodo, temperatura (18° a 35°C) e umidade. No Brasil, as regiões litorâneas dos estados da Bahia e Pernambuco possuem condições climáticas bastante favoráveis ao florescimento e viabilidade do pólen, onde estão localizadas as estações de hibridação de diferentes programas de melhoramento. Na ausência de condições climáticas específicas para o florescimento da cana-de-açúcar, podem ser utilizadas câmaras de fotoperíodo, às quais aplicam condições artificiais que induzem o seu florescimento (LANDELL e BRESSIANI, 2008).

A cana-de-açúcar é propagada vegetativamente. No entanto, o processo de melhoramento é longo e trabalhoso, o número de etapas de seleção pode variar entre os programas de melhoramento, atingindo quatro no programa da RIDESA e cinco nos programas do IAC e do CTC. Considerando o número de etapas e de cortes em cada etapa, pode-se concluir que o desenvolvimento de uma variedade de cana-de-açúcar é um processo que exige muito tempo, cerca 9-13 anos (LANDELL e BRESSIANI, 2008; BARBOSA e SILVEIRA, 2010).

Várias características são almejadas durante o processo de seleção, tais como: resistência ou tolerância a doenças, tolerância à seca, ausência de florescimento e isoporização, capacidade de brotação sob palha e elevada produtividade de açúcar (LANDELL e BRESSIANI, 2008).

2.2 DOENÇAS NA CANA-DE-AÇÚCAR

Existem vários fatores limitantes à produção de cana-de-açúcar, entre os quais, a ocorrência de doenças que é o principal motivo para a substituição de variedades, isso devido à queda de produtividade que elas podem provocar (SANTOS, 2008).

Na cana-de-açúcar, já foram descritas 177 doenças (provocadas por fungos, bactérias, vírus e fitoplasmas), das quais 40 já foram relatadas no Brasil (SANGUINO, 1983). As mais importantes, que causaram grandes prejuízos à cultura canavieira no Brasil são: carvão; escaldadura das folhas, raquitismo das soqueiras; mosaico; estria vermelha; ferrugem marrom, podridão abacaxi e mais recentemente a ferrugem alaranjada (CANAVIALIS, 2010).

2.3 FERRUGEM MARROM

2. 3.1 Importância econômica e história da doença

A ocorrência de doenças constitui um dos principais problemas para a obtenção de altas produtividades na cana-de-açúcar. Dentre as principais doenças a ferrugem marrom, causada pelo fungo *Puccinia melanocephala*, destaca-se por causar altas perdas em variedades suscetíveis. Nesse sentido, um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético é a obtenção de variedades resistentes a essa doença (MACCHERONI e MATSUOKA, 2009).

Desde seu primeiro relato na Índia em 1950 a ferrugem marrom acompanha as regiões canavieiras do mundo. No entanto, somente em 1978 foi considerada uma doença de importância econômica quando foi introduzida no caribe (RALOFF, 2001). Sua importância é devido às perdas que podem causar, visto que existem relatos de perdas de até 50% no México em 1981 (PURDY *et al.* 1983; COMSTOCK, 1994).

No Brasil a doença foi relatada pela primeira vez em 1986, no município de Capivari, São Paulo (AMORIM, 1987). Acredita-se que a doença veio do continente africano para o Brasil. Devido à fácil disseminação do patógeno pelo vento, a doença atingiu rapidamente outros estados, causando perdas de até 50% em variedades suscetíveis (MATSUOKA, 1999). Além disso, a ferrugem marrom causa também perdas para os programas de melhoramento, devido à eliminação de clones nas fases de seleção, com boas características agrônômicas, porém suscetíveis (COMSTOCK, 1994; TOKESHI e RAGO, 2005).

A doença alcançou seu pico em 1992 nos canaviais paulistas, estima-se que o prejuízo na produção chegou a 8,74% e as perdas a US\$107 milhões devido ao cultivo predominante de genótipos que não apresentavam níveis satisfatórios de resistência como a SP70-1143, SP71-6163, SP71-1406 e NA56-79 (CARDOSO E SANGUINO, 1988; MOURA, 1999).

Há diversos meios de controle da doença porém, o uso de variedades resistentes é o mais eficiente e econômico método de controle (TOKESHI e RAGO, 2005).

2.3.2 Sintomatologia e etiologia da doença

A ferrugem marrom é causada pelo fungo *Puccinia melanocephala*, pertencente à divisão Basidiomycota, classe Teliomycetes, ordem Uredinales, família Puccinaceae (SYD e P. SYD, 1907).

O fungo produz dois tipos de esporos os urediniósporos, esporos de reprodução assexual, e os teliosporos, esporos de reprodução sexual. Os urediniosporos possuem coloração marrom canela a marrom escuro, sem espessamento apical, ovóides, ornamentação equinulada, com quatro a cinco esporos germinativos equatoriais (MOURA, 1999; APARECIDO, 2016).

Ambos os esporos produzidos por *P. melanocephala* podem germinar, mas a infecção ocorre somente por meio dos urediniósporos, que são transportados principalmente pelo vento, além de gotas de água, roupas e materiais vegetais contaminados. A germinação do fungo é favorecida em temperaturas entre 21°C e 26°C e umidade relativa do ar acima de 99%. Para otimizar a germinação dos esporos é necessária a presença de água na superfície da folha (CARDOSO e SANGUINO, 1988).

Após a germinação o tubo germinativo é diferenciado em haustórios, o qual vai penetrar nos tecidos das plantas por meio dos estômatos e é responsável pela absorção de nutrientes. Entre 10 a 14 dias após a infecção é possível observar pústulas nas folhas, as quais irão liberar esporos para o meio ambiente (SAGUINO e TOLEDO, 1983).

A manifestação da doença é sazonal, sua ocorrência é favorecida por temperaturas amenas e estações úmidas, nos meses de junho a agosto e novembro a janeiro. Sob altas temperaturas e/ou baixa umidade os esporos tornam-se inviáveis (SANGUINO e TOLEDO, 1983; GARCIA *et al.*, 2007; GIGLIOTI *et al.*, 2009).

Os sintomas causados pela ferrugem marrom são semelhantes aos causados por outras ferrugens, ocorrendo na parte aérea da planta (Figura 1). O sintoma inicial do ataque é o aparecimento de pequenas pontuações cloróticas, as quais progridem para

manchas alongadas de coloração amarelada que podem ser observadas em ambas as superfícies das folhas. Essas manchas aumentam rapidamente de tamanho e adquirem coloração avermelhada. Na face inferior das folhas é possível observar as pústulas de coloração amarelada à marrom escuro. Em variedades altamente suscetíveis as pústulas agrupam-se e quando essas coalescem ocorre a necrose dos tecidos, geralmente nas folhas mais baixas, reduzindo a taxa fotossintética, a quantidade de perfilhos, a produção de biomassa e consequentemente, a produção de cana-de-açúcar (CARDOSO e SANGUINO, 1988; SACIOTO, 2003; MACCHERONI e MATSUOKA, 2009).



FIGURA 1: SINTOMAS DE FERRUGEM MARROM EM CANA-DE-AÇÚCAR. FONTE: VSISUGAR.COM, 2016.

As plantas mais sensíveis ao ataque do fungo são aquelas de dois a oito meses de idade, assim como cana-planta em relação à cana-soca. O patógeno tem curto ciclo de vida, permitindo o aparecimento de epidemias dentro de 5 a 6 semanas, e a cultura, de aspecto inicialmente verde, se torna avermelhada devido à formação maciça de pústulas na superfície abaxial das folhas (RYAN e EGAN, 1989).

A melhor maneira de se avaliar a doença é quantificando a porcentagem da área foliar sintomática, comparada à área foliar total (KLOSOWSKI *et al.*, 2013). A escala diagramática proposta por Amorim *et al.* (1987), é a mais utilizada atualmente, a qual estipula 9 notas, onde 1 a 3 refere-se às plantas classificadas como resistentes, 4 a 6 intermediárias, e 7 a 9 plantas suscetíveis. A avaliação é feita utilizando a folha + 3 de cada planta. Sood *et al.* (2009) propuseram uma escala para classificar a doença que vem sendo bastante utilizada devido a facilidade. As notas vão de 0 a 4, onde 0 = sem sintomas, 1 = manchas cloróticas, 2 = lesões, 3 = uma a cinco pústulas com esporulação e 4 = cinco ou mais pústulas com esporulações que coalescem, causando necrose na área foliar. Genótipos que apresentam nota de 0 - 1, são classificados como resistentes, 2, considerados moderadamente resistentes, e 3 - 4, suscetíveis.

2. 3.3. Melhoramento genético e a ferrugem marrom

A obtenção de genótipos resistentes a doenças é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético. A seleção de genótipos resistentes à ferrugem marrom acontece nas fases iniciais de um programa de melhoramento genético. Isso ocorre porque a herdabilidade da resistência à ferrugem marrom é alta. Diante disso uma boa estratégia para o desenvolvimento de variedades resistentes é a eliminação de parentais suscetíveis (COMSTOCK *et al.* 1994; HOGARTH *et al.* 1993; RAMDOYAL *et al.* 1996).

Ido *et al.* (2006), avaliaram a incidência e severidade da ferrugem marrom em clones de cana-de-açúcar no estado do Paraná e concluíram que os primeiros meses do ciclo de desenvolvimento da cana-de-açúcar podem ser mais eficientes para a seleção de clones resistentes à ferrugem. A seleção para indivíduos resistentes a ferrugem marrom é facilmente realizada na terceira fase de seleção (T3), onde os clones são avaliados quanto ao grau de severidade à doença. Nas fases finais, é feito um estudo detalhado com a finalidade de integrar resistência e manejo da época de plantio e colheita para controlar a doença em clones que possuem certo grau de suscetibilidade, mas que apresentam grande potencial produtivo (MATSUOKA *et al.*, 1999; MOURA, 1999).

Tai *et al.* (1981) sugeriram que a resistência à ferrugem marrom é parcialmente dominante. Entretanto, Hogarth *et al.* (1993), por meio de uma reanálise de dados,

concluiu que 67% da variância genética é aditiva, e que a resistência à ferrugem marrom apresenta alta herdabilidade. Sordi *et al.*, (1988), destacaram a importância da escolha dos genitores, onde cruzamentos entre genitores resistentes dariam origem a progênes resistentes à doença, visto que essa é uma característica de alta herdabilidade e transmitida com eficácia.

Daugrois *et al.* (1996) e Ramdoyal *et al.* (1996) utilizaram progênes de autofecundação da variedade resistente a ferrugem marrom R570 e observaram uma segregação de 3:1 (resistência: suscetibilidade) indicando que existe um gene de efeito maior o qual confere resistência a ferrugem marrom.

Asnaghi *et al.* (2000) inocularam a variedade R570 com isolados de *P. melanocephala* provenientes do Brasil, Colômbia, Flórida, Guadalupe e Zimbábue, sendo verificado a existência de um único gene principal (“major gene”) responsável pela resistência à ferrugem marrom, indicando que esse possui grande potencial de melhorar a resistência à ferrugem marrom em diversas regiões geográficas.

A durabilidade da resistência à ferrugem marrom é considerada finita devido à variabilidade do patógeno, bem como a habilidade de *P. melanocephala* de adaptar, superando a resistência da planta. Na Flórida, por exemplo, as variedades CP78-1247 (RAID *et al.*, 2000), CL73-239 e CP74-2005 (SHINE *et al.*, 2005), classificadas como resistentes, passaram a ser suscetíveis, caso semelhante aconteceu em Louisiana com a variedade LCP85-384, que ocupava 90% da área plantada (GLYNN *et al.*, 2012). Esse fenômeno pode ser explicado pelo ciclo de “boom-and-bust” proposto por Priestly (1978), que ocorre quando uma determinada variedade resistente é largamente utilizada em campo, criando uma pressão de seleção pelo patógeno levando ao aparecimento de uma nova raça do fungo e, por consequência, quebra a resistência da variedade.

2. 4. RESISTÊNCIA DE PLANTAS E VARIABILIDADE DE *Puccinia melanocephala*

O uso de variedades resistentes apresenta vantagens em relação a outros métodos de controle como: requerem pouca ou nenhuma tecnologia adicional para seu uso, o custo é compatível com o que os produtores podem pagar e não são poluentes ao meio ambiente. As plantas podem ser definidas como resistentes e tolerantes, a resistência descreve os efeitos de genes de uma dada planta hospedeira capazes de restringir ou mesmo prevenir a multiplicação do patógeno em seus tecidos. A tolerância ao dano é independente da resistência e diz respeito à habilidade de uma dada planta hospedeira em compensar ou recuperar-se dos efeitos adversos de ataque por determinado patógeno e produzir bem (TRUDGILL, 1991).

Para que ocorra a resistência da planta a mesma reconhece a ação do patógeno e ativa mecanismos de defesa. Uma planta que não reconhece o patógeno é suscetível. Na natureza, a resistência de plantas a doenças é regra ao passo que a suscetibilidade é exceção, pois há uma infinidade de microrganismos aos quais as plantas estão diariamente expostas, e apenas uma pequena porção desses microrganismos é capaz de causar doenças em plantas. Esse fato é garantido por mecanismos pré-formados (espessura da cutícula, número e disposição de estômatos e tricomas) e pós-formados (substâncias químicas como fungitóxicas e antiproteicas) atuantes nessas plantas e que em conjunto é chamada de resistência de planta não hospedeira (PASCHOLATI, 1995). Além dessas barreiras físicas e químicas as plantas possuem ainda um sistema de defesa que possibilita a identificação de microrganismos patogênicos.

Assim como resistência e tolerância relacionam-se à planta hospedeira, os termos correspondentes aplicados ao patógeno são patogenicidade e virulência. Patogenicidade refere-se à capacidade do patógeno de causar doença, ou dano (no geral, medido em termos de redução na produção), e virulência a sua capacidade de suprimir ou neutralizar a ação dos genes de resistência da planta (TRUDGILL, 1991).

Quando determinado patógeno se torna adaptado a uma espécie de planta esse suprime, por meio de fatores de virulência, parte dos mecanismos de defesa da planta. Porém, quando a planta hospedeira possui genes específicos de resistência que a tornam

capazes de detectar a presença do patógeno e suprimir os seus fatores de virulência, o estabelecimento desse na planta não ocorre. A evolução do patógeno ocorre, então, quando ele se torna capaz de se estabelecer na planta sem que essa detecte sua presença (BENT e MACKEY, 2007).

As interações plantas-patógenos são co-evolutivas, marcadas por relações geneticamente controladas por patógenos e seus hospedeiros. Assim, quando ocorrem modificações genéticas em um dos componentes, podem ocorrer modificações genéticas na população do outro (CAMARGO, 1995). Uma metáfora popular na literatura vê a co-evolução de genes R de resistência na planta e Avr de avirulência no hospedeiro como uma corrida armamentista. Nesta, um gene R é derrotado como resultado de uma mutação no gene de avirulência correspondente, que permite ao patógeno escapar ao reconhecimento pelo hospedeiro (ELLIS *et al.*, 2000), essa interação permite então que novos níveis de relação entre esses organismos possam ser gerados.

A existência de diferentes raças fisiológicas de *P. melanocephala* não é um consenso. Um estudo realizado na Flórida sugeriu a existência de quatro raças patogênicas, levantando a hipótese de que variantes patogênicas surgem nas regiões produtoras e são paralelas ao desenvolvimento de novas variedades (SHINE *et al.* 2005). Porém, Asnaghi *et al.* (2001) demonstraram que o principal gene de resistência relacionado à ferrugem marrom provoca resistência contra vários isolados coletados em diferentes áreas geográficas, e Asnaghi *et al.* (2004) relatam que a quebra de resistência à ferrugem não foi observada nas Ilhas Reunião e em vários outros lugares nas últimas décadas, apesar do intensivo cultivo da variedade R570 nesses locais.

2.4.1 Herança da resistência da cana-de-açúcar à ferrugem marrom

Já foi ressaltado anteriormente que a ferrugem marrom é controlada principalmente pelo uso de variedades resistentes à doença (MAGAREY, 2005). Por isso, diversos estudos sobre a herança da resistência à ferrugem marrom vêm sendo conduzidos.

Usando uma população de auto fecundação da variedade R570, Daugrois *et al.* (1996) identificaram um gene maior de resistência (*Brul*), que segregava como um gene

simples dominante. Um mapeamento adicional para a mesma população realizado por Asnaghi *et al.* (2000) utilizando a sintenia entre *Poaceae* determinou a localização do gene de resistência no grupo de ligação VII do mapa da R570.

Asnagui *et al.* (2004) utilizaram marcadores AFLP em um *bulk* da progênie de R570 de 695 indivíduos, identificaram oito marcas rodeando o gene *Bru1*. Os autores demonstraram que o principal gene de resistência relacionado à ferrugem marrom provoca resistência contra vários isolados coletados em diferentes áreas geográficas.

Analisando um painel de 380 cultivares onde dois marcadores moleculares PCR- específicos o R12H16 e o 9O20-F4 foram ligados ao gene de efeito maior de resistência à ferrugem (*Bru1*), Costet *et al.* (2012) confirmaram esse gene em 86% dos 194 acessos resistentes utilizados, revelando que constitui a principal fonte de resistência das variedades modernas. Nesse estudo os autores verificaram a ausência de marcas ligadas à *Bru1* em algumas variedades resistentes, indicando a presença de outras fontes de resistência à ferrugem marrom, o que corrobora com Raboin *et al.* (2006), que observaram outro gene de resistência à ferrugem marrom utilizando uma população de mapeamento entre o clone MQ76-53 e a variedade R570, chamando-o de *Bru2*, que foi considerado o segundo gene maior de resistência conhecido para resistência à ferrugem marrom em cana-de-açúcar.

Em estudo na Florida, Glynn *et al.* (2012) utilizaram os marcadores que flanqueiam o gene *Bru1* para determinar a frequência do mesmo nos clones utilizados no Programa de Melhoramento Genético Canal Point (CP). Os marcadores foram positivos em 285 dos 1.072 clones (27%), os quais representam a base genética das variedades desenvolvidas na Flórida. Dos clones classificados como resistentes a ferrugem marrom, 59% possuem o gene *Bru1*, enquanto que nenhum dos clones classificados como suscetíveis contem o gene. Além disso, foram genotipados 603 clones, os quais foram separados de acordo com a década de seu lançamento. Nesse estudo foi observado o crescimento da frequência do *Bru1* ao longo dos anos, que coincide com a introdução da ferrugem-marrom na Flórida (1979). Os resultados apresentados mostram que o gene *Bru1* é a principal fonte de resistência à ferrugem-marrom na Flórida.

Em Tucumán, Argentina, a frequência do gene *Bru1* foi baixa. Dos 129 genótipos avaliados, 49 foram classificados como resistentes, e apenas 8 (16,3%) possuem o gene. A baixa frequência do gene indica que provavelmente existe outra fonte de resistência à ferrugem-marrom no banco de germoplasma de Tucumán, a qual pode ser importante para ampliar a estreita base genética da resistência à ferrugem-marrom (RACEDO *et al.*, 2013).

Parco *et al.* (2014) determinaram a frequência do gene *Bru1* em 506 clones, dentre os materiais estão inclusos: variedades, clones elites, clones de primeira geração e acessos de germoplasma exótico/selvagem utilizados pelo Programa de Melhoramento Genético de Louisiana-USA. A maior frequência do gene *Bru1* (28,7%) foi observada no grupo de acessos de germoplasma. Em variedades e clones elites apenas 4,3% dos genótipos possuem o gene. Além disso, alguns genótipos apresentaram variação no tamanho das bandas geradas por meio dos produtos de amplificação dos *primers* R12H16 e 9020-F4, sugerindo uma possível variação alélica do gene *Bru1*.

Em estudo mais recente aqui no Brasil, Neuber *et al.* (2017) utilizaram 391 genótipos, entre eles as principais variedades plantadas atualmente no país e verificaram a presença do *Bru1* em 73,5 % das variedades. Os autores ressaltam a eficiência do gene para a resistência à ferrugem marrom e que o uso dos marcadores deve ser aplicado nas etapas iniciais dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar. O que corrobora com Barreto *et al.* (2017), que validaram a eficiência dos marcadores R12H16 e 9020-F4 e afirmaram que os mesmos são altamente eficientes em predizer a resistência à ferrugem marrom.

2.5. O USO DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Nos programas de melhoramento, os marcadores têm várias aplicações, tais como: (1) auxiliar na identificação de genótipos superiores envolvidos em policruzamentos de forma a direcionar os cruzamentos; (2) estimar a variabilidade existente, a fim de não restringir a base genética do material e explorar a heterose proveniente de cruzamentos entre indivíduos divergentes; (3) identificar genes específicos ou regiões que contenham genes responsáveis por caracteres qualitativos e

quantitativos, o que permite direcionar a seleção dos indivíduos por meio de seu genótipo, ainda nas primeiras fases de seleção, ou mesmo desenvolver plantas transgênicas. Além dessas vantagens, os marcadores moleculares são extremamente úteis, pois são numerosos e não são alterados devido a condições ambientais e/ou estágio de desenvolvimento do organismo (CRESTE *et al.*, 2008; KALIA *et al.*, 2011).

Os marcadores moleculares começaram a ser utilizados na década de 80 e são assim denominados por utilizarem o polimorfismo da molécula de DNA, havendo por isso grande variedade de técnicas desenvolvidas. Os marcadores moleculares ocorrem em grande número, o que possibilita a saturação de genomas de diferentes espécies e o mapeamento dos locos que controlam caracteres quantitativos, o que não era possível com o uso de marcadores fenotípicos e isoenzimáticos até então disponíveis devido à baixa cobertura do genoma para trabalhos com caracteres quantitativos (THODAY, 1961).

O uso de marcadores moleculares também tem contribuído na identificação e caracterização dos efeitos fenotípicos de genes de resistência a pragas e doenças de diversas culturas (SIMCOX e BENNETZEN, 1993; BRUNELLI *et al.*, 2002).

Existe uma grande variedade de marcadores moleculares, dentre esses baseados na hibridização, destaca-se o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). O surgimento de técnicas baseadas na Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) possibilitou a ampliação do uso de marcadores moleculares devido à facilidade de emprego, rapidez, versatilidade e sensibilidade do método. Entre os marcadores baseados em PCR estão o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) (VARSHNEY *et al.*, 2005; KALIA *et al.*, 2011).

Foram encontrados dois marcadores, R12H16-PCR e 9020-F4-RsaI, que estão ligados ao gene *Bru1* no mapa genético da variedade R570, e mostraram-se fortemente associados a resistência a ferrugem-marrom, visto que os marcadores foram totalmente ausentes em acessos suscetíveis (COSTET *et al.*, 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADOS

Um total de 24 genótipos de cana-de-açúcar foram utilizados neste estudo, sendo 14 pertencentes à RIDESA (sigla RB), 8 do Centro de Tecnologia Canavieira e COPERSUCAR (siglas SP e CTC), a variedade R570 como controle positivo para o gene Bru1 e a variedade NA56-79 como controle negativo (Tabela 1).

TABELA 1: GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AVALIADAS QUANTO A PRESENÇA DO GENE BRU1 E SEUS RESPECTIVOS GENITORES.

GENÓTIPOS	GENITOR FEMININO	GENITOR MASCULINO
CTC4	SP83-5073	?
CTC15	SP84-2025	?
NA56-79	Co419	SELF
R570	H32-8560	R445
RB006970	RB855536	SP80-1816
RB036066	SP70-1143	SP77-5181
RB036088	RB855595	?
RB036091	RB855589	?
RB036152	SP83-5073	RB867515
RB72454	CP53-76	?
RB835054	RB72454	NA56-79
RB845210	RB72454	SP70-1143
RB855156	RB72454	TUC71-7
RB855453	TUC71-7	?
RB855536	SP70-1143	RB72454
RB867515	RB72454	?
RB92579	RB75126	RB72199
RB966928	RB855156	RB815690
SP70-1143	IAC48-65	?
SP80-1816	SP71-1088	H57-5028

SP80-1842	SP71-1088	H57-5028
SP80-3280	SP71-1088	H57-5028
SP81-3250	CP70-1547	SP71-1279
SP83-2847	HJ5741	SP70-1143

A escolha das variedades foi baseada nas 10 mais plantadas na região centro-sul do Brasil, e alguns genótipos que não tinham a informação quanto a presença ou ausência do gene *Bru1*, considerados variedades promissoras para o programa de melhoramento da RIDESA. As variedades SP70-1143 e NA56-79 foram escolhidas como controles negativos e também por serem genitores importantes.

3.2 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA

O DNA foi extraído de amostras de folhas das variedades/clones promissores provenientes da Estação Experimental da UFPR em Paranavaí, PR. As folhas +3 foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos e enviadas para o Laboratório de Epidemiologia Molecular, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR. No qual, prosseguia-se à extração de DNA. Para a mesma, foi usado aproximadamente 3 gramas de tecido vegetal, que foi macerado com nitrogênio líquido até formar um pó fino.

A extração de DNA aconteceu de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. Para a precipitação do *pellet* as amostras ficaram incubadas com isopropanol gelado por um dia no *freezer* a -20°C . Como o *pellet* estava muito escuro foi realizada a lavagem com NaCl que é um passo opcional do protocolo e para evitar perdas de DNA com o excesso de lavagens só foi usado o álcool 70% uma vez.

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop ND- 2000c (*ThermoScientific*) e 1 μL de cada amostra. A relação entre as absorbâncias 260/280 nm foi utilizada para estimar a contaminação por proteínas, e as absorbâncias 230/260 nm para verificar possível contaminação por sais ou compostos fenólicos. Foram considerados de boa qualidade os DNAs cuja relação

230/260 nm e 260/280 nm estivessem entre 1,8 e 2,0. Além disso, para comprovar a integridade do DNA, o mesmo foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após a quantificação o DNA foi diluído em TE pH 8,0 para a concentração de 50 ng/ul.

3.3 AMPLIFICAÇÃO COM OS PARES DE PRIMERS R12H16 E 9020-F4 E DIGESTÃO COM A ENZIMA RSAI

Para a obtenção dos fragmentos específicos (marcadores) de 570 pares de bases (pb) e de 200 pb indicadores da presença do gene *Brul*, foram utilizados respectivamente os pares de primers R12H16 e 9020-F4 descritos por COSTET *et al.*, (2012).

O protocolo para a reação de PCR foi o mesmo descrito por Costet *et al.*, (2012), com algumas modificações efetuadas. Ambas as reações foram conduzidas em um volume final de 25 µl contendo: 12,5µl de PCR MasterMix que já contem a TAQ, MgCl₂ e DNTP's em concentrações ótimas de uso, 1µM de primer Forward e 1µM de primer Reverse, 50 ng de DNA genômico e água miliQ.

O programa de amplificação foi o mesmo para os dois primers de acordo com a ciclagem a seguir: desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos, cada ciclo a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 55°C por 45 segundos, e extensão de 72°C por 72 segundos, seguida de um passo de extensão final a 72°C por 8 minutos em termociclador Mytermocycler (BioRad).

Para o par de primer 9020-F4, após a PCR foi feita a digestão do produto amplificado utilizando 15 µL do mesmo, 5 U/µL da enzima *RsaI*, Buffer 1x, 50 mM acetato de potássio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio e 100 µL/mL de BSA pH 7,9, completando-se com água até o volume de 25 µL. Os produtos da reação foram incubados em termociclador a 37°C por 2 horas para a produção de um fragmento específico de 200 pb.

3.4 VISUALIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE 570 PB E 200 PB

Aos produtos da amplificação pelo par de primers R12H16 e da digestão do produto da amplificação gerado pelo par de primer 9020-F4 foram adicionados cerca de 3 µL de corante de carregamento 6X Blue/Orange loading dye. Os produtos dessas reações foram submetidos separadamente a eletroforese em gel de agarose a 2%, para o par de primer R12H16, e a 3%, para o par de primers 9020-F4 *RsaI*, utilizando como marcador de peso molecular o ladder de 100 pb. Os marcadores foram visualizados em transluminador UV (AlphaInnoteck).

A variedade R570 foi utilizada em todas as reações de amplificação como padrão positivo, visto que, a mesma possui o gene *Bru1*, como descrito em literatura (ASNAGUI et al., 2004).

3.5 AGRUPAMENTO DAS VARIEDADES QUANTO À SUSCETIBILIDADE OU RESISTÊNCIA À *Puccinia melanocephala*

A associação da presença do gene *Bru1* com a resistência à ferrugem marrom das variedades/clones promissores avaliados foi feita com base em informações bibliográficas (SANTOS, 2008; CATÁLOGO NACIONAL DE CULTIVARES RB DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2010 e 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA

A extração de DNA é a principal etapa para se ter sucesso nas análises de DNA, independente do tipo de estudo molecular que será feito, as preparações de DNA devem produzir amostras puras suficientes para não inibir os tratamentos enzimáticos ou interferir nos padrões de migração de gel em eletroforese (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Diversos autores descrevem problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal de boa qualidade, principalmente contaminações com polissacarídeos, compostos fenólicos e secundários.

Por meio da quantificação por espectrofotometria foi possível verificar a qualidade do DNA extraído para poder verificar possíveis contaminações com os compostos descritos. Os valores das relações entre as absorbâncias 260/280 e 230/260 ficaram próximos a 2, que é considerado o ideal para amostras sem contaminações por proteínas e compostos fenólicos (Tabela 2). A qualidade da extração foi confirmada em gel de agarose 0,8% (Figura 2).

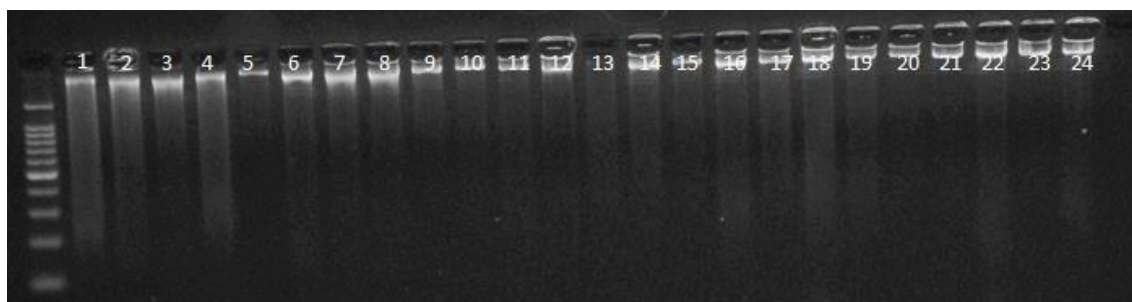


FIGURA 2: GEL DE AGAROSE 0,8% MOSTRANDO A QUALIDADE DA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS 24 VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADAS PARA AVALIAR A PRESENÇA DO BRU1.

TABELA 2: QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR EM NANODROP ND-2000C (THERMOSCIENTIFIC).

Variedade	DNA ng/μl	260/280	260/230
RB006970	484,8	2,03	2,10
RB845210	543,0	1,98	1,99
RB855536	2732,6	1,97	2,12
RB855453	241,9	1,94	1,90
RB036088	217,5	2,06	2,00
RB966928	4762,3	1,96	2,17
RB036091	1261,3	2,09	2,11
RB036152	281,1	2,07	1,86
RB835054	474,0	2,07	1,86
RB036066	464,9	2,11	2,00
RB855156	1244,3	2,19	2,09
RB867515	1678,4	2,07	2,16
RB92579	1871,6	1,89	2,21
RB72454	567,8	1,97	1,89
SP70-1143	482,4	2,02	1,98
SP83-2847	1742,3	2,10	2,15
SP81-3250	507,7	2,08	2,02
SP80-1816	2777,3	2,05	2,80
SP80-1842	461,2	2,11	2,04
SP80-3280	2194,8	2,04	2,10
CTC4	1843,9	2,07	2,18
CTC15	2742,5	2,09	2,18
NA56-79	112,3	2,09	1,44
R570	738,1	2,11	2,13

4.2 FREQUÊNCIA DO GENE BRU1 NOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Foi verificada em 20 (83,33%) dos 24 genótipos analisados a presença dos marcadores moleculares R12H16 e 9O20-F4 ligados ao gene Bru1 (Figura 3), indicando que esse gene é a principal causa de resistência à ferrugem marrom. A elevada frequência do Bru1 nas variedades deste estudo e em demais estudos pode ser devido ao fato de que os programas de melhoramento genético buscam como parentais nos cruzamentos variedades promissoras e resistentes às principais doenças da cana-de-açúcar.

Apesar de os programas de melhoramento genético buscarem como parentais variedades resistentes a ferrugem marrom, geralmente a avaliação para a resistência a doenças é feita só a nível de campo dispensando a análise molecular. A descoberta do Bru1 (DAUGROIS et al., 1996) e o desenvolvimento dos marcadores moleculares

R12H16 e 9020-F4 para sua detecção (COSTET *et al.*, 2012) foi o primeiro caso de sucesso da seleção assistida por marcadores moleculares na cana-de-açúcar.

Como ressaltado, as variedades SP70-1143 e NA56-79 são genitores em diversos cruzamentos e ambas são negativas para a presença do Bru1. É importante que os programas de melhoramento genético obtenham essa informação para que nos cruzamentos usem como um dos parentais uma variedade que tenha o gene Bru1, um exemplo é a variedade RB72454, a qual é uma variedade utilizada em diversos cruzamentos e possui o gene Bru1.

Outro exemplo da importância do conhecimento prévio da presença do gene Bru1 nos parentais é a variedade CTC4, pois a mesma está entre as mais plantadas no Brasil, porém é classificada como suscetível à ferrugem marrom e não possui o gene Bru1. Essa variedade tem como genitor materno a variedade SP83-5073, que é suscetível a ferrugem marrom e não apresenta o gene Bru1 e não se conhece o genitor paterno (NEUBER *et al.*, 2017). A falta de conhecimento do genitor masculino em cana-de-açúcar é comum, como a variedade RB867515, que possui como genitor feminino a variedade RB72454 e não se tem conhecimento do genitor masculino.

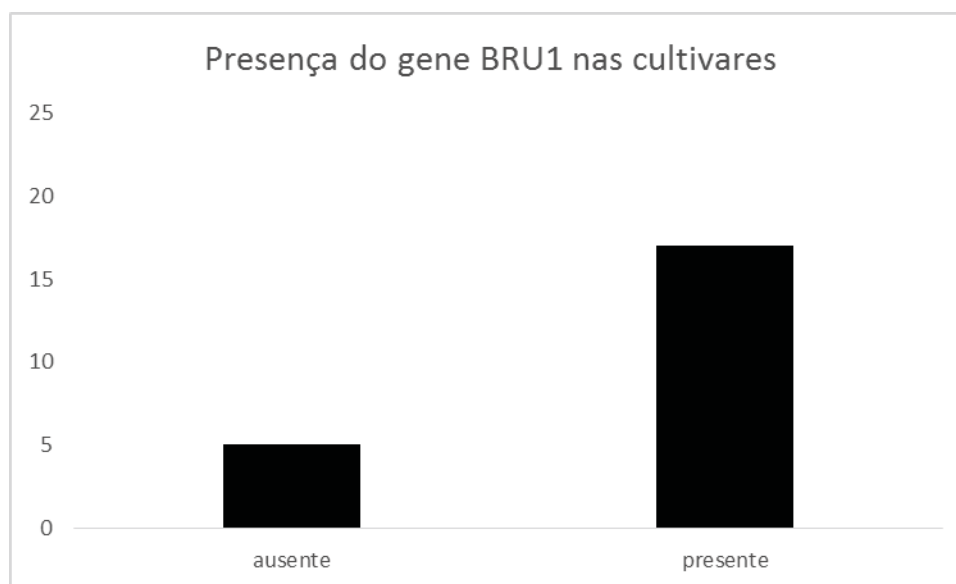


FIGURA 3: PRESENÇA DO GENE BRU1 EM VARIEDADES E CLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDOS À GENOTIPAGEM COM MARCADORES MOLECULARES QUE FLANQUEIAM O GENE BRU1.

As variedades utilizadas neste trabalho que não possuem o gene *Bru1* foram: NA56-79, SP70-1143, SP80-1842 e CTC4, todas suscetíveis à ferrugem marrom (Tabela 3), (Figura 4).

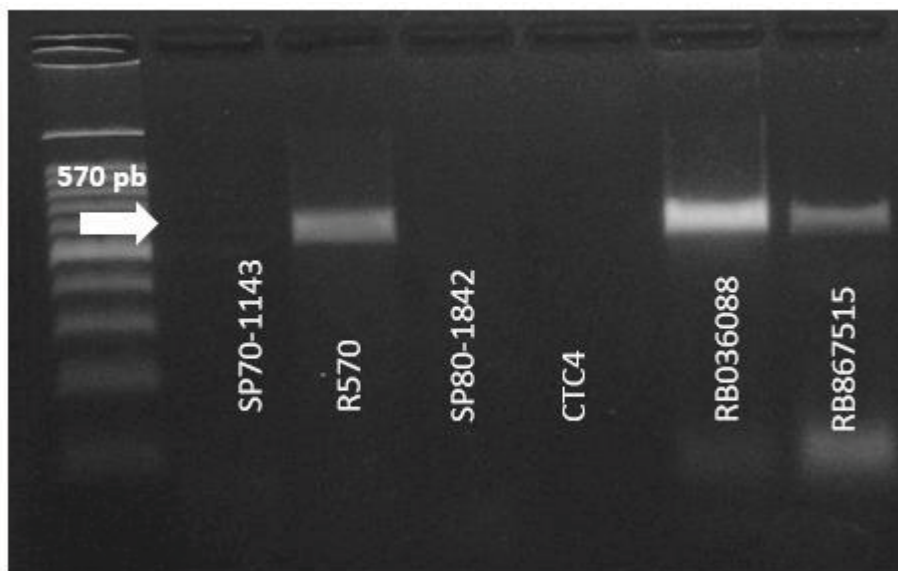


FIGURA 4: GEL DE AGAROSE 2% MOSTRANDO A AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR UTILIZANDO OS PARES DE PRIMERS R12H16.

Esse resultado já era esperado baseado nas características genealógicas das variedades e pelas mesmas serem classificadas como suscetíveis. Entre as variedades suscetíveis, a CTC-4 e a SP80-1842 estavam entre as mais plantadas no ano de 2015, a CTC4 teve uma participação de 7,7% aparecendo em 5º lugar no censo varietal e a SP80-1842 de 1,4% ocupando a 14ª posição (CENSO VARIETAL, 2015). Em relação à ferrugem marrom, como mencionado, para que a doença ocorra é necessária a interação: patógeno, variedade e ambiente. O patógeno deve ter agressividade para infectar a cultura, a variedade deve apresentar suscetibilidade para o desenvolvimento da doença e o ambiente deve ser favorável para que a mesma ocorra. A ferrugem marrom é favorecida por temperaturas amenas e alta umidade relativa do ar, se o ambiente não for favorável para que a doença ocorra pode-se muitas vezes classificar erroneamente uma variedade como resistente, por isto é importante que além da avaliação à campo seja feita a avaliação molecular para a presença do gene *Bru1*.

TABELA 3: GENOTIPAGEM DAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRESENÇA (+) OU AUSÊNCIA (-) DOS MARCADORES R12H16 E 9020-F4 E O FENÓTIPO DE ACORDO COM A LITERATURA QUANTO À RESISTÊNCIA (R) OU SUSCETIBILIDADE (S) A FERRUGEM MARROM.

VARIEDADE	R12H16	9020-F4	FENÓTIPO
RB006970	+	+	R
RB845210	+	+	R
RB855536	+	+	R
RB855453	+	+	R
RB036088	+	+	R
RB966928	+	+	R
RB036091	+	+	R
RB036152	+	+	R
RB835054	+	+	R
RB036066	+	+	R
RB855156	+	+	R
RB867515	+	+	R
RB92579	+	+	R
RB72454	+	+	R
R570	+	+	R
SP83-2847	+	+	R
SP80-3280	+	+	R
SP81-3250	+	+	R
SP80-1816	+	+	R
CTC15	+	+	R
SP70-1143	-	-	S
SP80-1842	-	-	S
CTC4	-	-	S
NA56-79	-	-	S

Em uma primeira análise somente com o marcador R12H16 a variedade RB036088 teve um resultado negativo para o gene *Bru1*. No entanto devido a ocorrência de falsos negativos a análise de PCR com ambos os marcadores moleculares foi repetida três vezes confirmando assim a presença do *Bru1* (Figura 5), sendo o falso negativo devido à alguma falha o que é comum em análises moleculares.

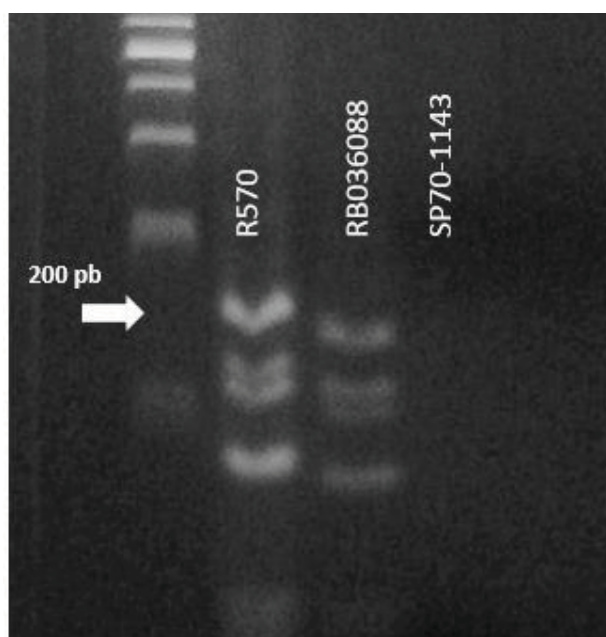


FIGURA 5: GEL DE AGAROSE 3% MOSTRANDO A AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR UTILIZANDO OS PARES DE “PRIMERS” 9020-F4 APÓS DIGESTÃO COM ENZIMA RSAI.

A durabilidade da resistência à ferrugem marrom é incerta, isso porque os estudos mostram que a doença esta sendo controlada principalmente por um gene de efeito maior e o patógeno está constantemente buscando a habilidade em se adaptar à planta hospedeira, visto que quebras de resistência já foram reportadas em importantes variedades na Flórida como a CP78-1247 (RAID, 1989), CP79-1580 (DEAN E PURDY, 1984), CP74-2005 e CL73-239, as quais eram largamente utilizadas criando uma pressão de seleção pelo patógeno, levando ao aparecimento de uma nova raça do fungo e que, por consequência quebra a resistência da variedade (SHINE, *et al.*, 2005).

Diante disso, é necessário buscar outras fontes de resistência e diversificar as variedades utilizadas, visando diminuir a pressão de seleção natural do patógeno e a emergência de novas raças do mesmo.

Um fator importante para o manejo da resistência é a busca de uma resistência quantitativa, ou seja, controlada por diversos genes. Em alguns estudos já foi reportado à presença de outros genes de efeito menor controlando a resistência à ferrugem marrom. Costet *et al.* (2012) verificou a ausência de marcas ligadas à Bru1 em variedades resistentes, indicando a presença de outras fontes de resistência à ferrugem marrom, o que corrobora com Raboin *et al.* (2006), que observou outro gene de

resistência à ferrugem marrom utilizando uma população de mapeamento entre o clone MQ76-53 e a variedade R570, chamando-o de Bru2, que foi considerado o segundo gene maior de resistência.

Racedo *et al.* (2013) avaliaram a frequência do gene Bru1 em 129 variedades e clones frequentemente utilizados em cruzamentos pelo programa de melhoramento EEAO, Tucumán- Argentina, dentre os quais 49 (38%) genótipos foram classificados como resistentes e apenas 8 (16,3%) possuem os marcadores indicativos da presença do gene Bru1.

Além disso, todos os genótipos classificados como suscetíveis, não apresentaram os marcadores ligados a este gene. Glynn *et al.* (2012), também observaram baixa frequência do gene Bru1 nos clones usados em cruzamentos, os quais representam a base genética das cultivares desenvolvidas em Flórida, ou seja, 285 de 1.072, ou seja, (27%) dos clones possuem o gene Bru1. Por outro lado, a frequência do gene Bru1 foi alta em clones CP (Canal Point) e baixa em clones da Louisiana (6%). Analisando a frequência do gene Bru1 em clones de Louisiana, Parco *et al.*, (2014), também observou baixa frequência desse gene, apenas 14 dos 208 clones avaliados (6,7%) possuem os marcadores indicativos da presença do gene Bru1.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados aqui apresentados é possível concluir que o gene *Bru1* é a principal fonte de resistência à ferrugem marrom, visto que o gene está presente em 20 das 24 variedades/clones promissores analisados (83,4%), sendo que todas as variedades/clones promissores com a presença do gene *Bru1* classificadas como resistentes a ferrugem marrom. As quatro variedades que não apresentaram o gene *Bru1* foram: NA56-79, SP70-1143, CTC4 e SP80-1842, sendo todas classificadas como suscetíveis a ferrugem marrom.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L, A. BERGAMIN-FILHO, C. CARDOSO, V. A. MORAES & C. R. FERNANDES. Metodologia de avaliação da ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). Boletim Técnico Copersucar, São Paulo, 39 (1): 13-16, 1987.
- APARECIDO, C. C. Diagnose de Uredinales (ferrugens).Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/Diagnose/Index.htm>. Acesso em: 31 de julho de 2016.
- ASNAGUI, C.; PAULET, F.; KAYE, C.; GRIVET, L.; DEU, M.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. Application of synteny across Poacea to determine the map location of sugarcane rust resistant gene. Theoretical and Applied Genetics, New York, v.101(5-6), p.962-969, 2000.
- ASNAGHI, C.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C.; ROTT, P. Resistance of sugarcane cultivar R570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. Plant disease, Saint Paul, v. 85, n. 3, p. 282-286, 2001.
- ASNAGHI, C.; ROQUES, D.; RUFFEL, S.; KAYE, C.; HOARAU, J.-Y.; TÉLISMART, H.; GIRARD, J.C.; RABOIN, L.M.; RISTERUCCI, A.M.; GRIVET, L.; D'HONT, A. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (*Bru1*) using bulked segregant analysis and AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 108, n. 4, p. 759-764, 2004.
- BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO (BNDES); CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, 2008. 316 p.
- BARBOSA, M. H. P.; SILVEIRA, L. C. I. Melhoramento genético e recomendação de cultivares. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Eds). Cana-de-açúcar- Bioenergia, Açúcar e Álcool- Tecnologias e Perspectivas. Viçosa: UFV, 2010. p. 313-331.
- BARRETO, F.Z.; BALSALOBRE, T.W.A. CHAPOLA, R.G.; HOFFMANN, H.P.; CARNEIRO, M.S. Validation of molecular markers associated with brown rust resistance in sugarcane. Summa Phytopathologica, v.43, n.1, p.36-40, 2017.
- BENT, A. F.; MACKEY, D. ELICITORS, EFFECTORS, AND R GENES: The new paradigm and a lifetime supply of questions. Annual Review of Phytopathology, v. 45, p: 399-436, 2007.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. Marcadores Moleculares. Melhoramento de plantas. 4 ed. Viçosa: UFV, 2005. cap. 30, p. 441-463.
- BRESSIANI, J. A.; Seleção sequencial em cana-de-açúcar. 2011. 104p. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de

Plantas)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BRUNELLI, K.R.; SILVA, H.P.; CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de genes de resistência quantitativa a Puccinia polysora em milho. Fitopatologia Brasileira v. 27, p.134-140, 2002

CANAVIALIS. Doenças: o perigo está à espreita, 2010. Disponível em: <http://www.canavialis.com.br/newsletter/CanaVialis_Results_Report_9Edicao.pdf>. Acesso em: 21/09/2016.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.T.; DE BRITO, G.G.; SAKIYAMA, S.S. (2006) Tipos de marcadores moleculares. Ed. BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. In: Marcadores Moleculares, Viçosa –MG, p. 09-78.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, 2009, p. 95-102.

CAMARGO, L.E.A. Análise Genética da Resistência e da Patogenicidade. Ed. BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. In: Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos vol 1. Piracicaba: Editora Ceres, 1995, p.470-492.

CARDOSO, C. O. N.; SANGUINO, A. Ferrugem da cana-de-açúcar. In: 4º SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA COPERSUCAR, 4., 1988, Piracicaba. Anais...Piracicaba: Ave Maria LTDA, 1988. p. 609-625.

CATÁLOGO NACIONAL DE VARIEDADES RB DE CANA-DE-ACÚCAR / Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. – Curitiba, 2010.

CATÁLOGO NACIONAL DE VARIEDADES RB DE CANA-DE-ACÚCAR / Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. – Curitiba, 2014

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: Cana-de-açúcar, 2º Levantamento. Brasília, 2016, 22p.

CESNIK, R. MIOCQUE, J. Melhoramento da Cana-de-açúcar. Brasília: Embrapa, 2004. 307 p.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. Guia da cana-de-açúcar: Avanço científico beneficia o País. São Paulo: CIB, 2009. 20 p.

COMSTOCK, J. C.; RAID, R. N. Sugarcane common rust. In: Current Trends in Sugarcane Pathology (Pro. K. S. Bhargava Festschrift), RAO, G. P.; GILLASPIE JR., A. G.; UPADHYAYA, P. P.; BERGAMIN FILHO, A.; AGNIHOTRI, V. P.; CHEN, C. T. (Eds.), New Delhi: International Books and Periodical Supplly Servise, 1994. p. 1-10.

COSTET, L.;LE CUNFF, L.;ROYAERT, S.;RABOIN, L.M.;HERVOUET, C.;TOUBI,L.;TELISMART, H.; GARSMEUR,O.; ROUSSELLE, Y.; PAUQUET, J.;NIBOUCHE, S.; GLASZMANN, J.C.; HOARAU, J.Y.; D’HONT, A. Haplotype

structure around Bru1 reveals a narrow genetic basis for brown rust resistance in modern sugarcane cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.125, p.825-836, 2012.

CRESTE, S.; ROSA-JÚNIOR, V. E.; PINTO, L. R.; ALBINO, J. C.; FIGUEIRA, A. V. O. A biotecnologia como ferramenta para o melhoramento genético. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). *Cana-de-açúcar*. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p. 157-176.

DAUGROIS J.H.; GRIVET L.; ROQUES D.; HOARAU J.Y.; LOMBARD H.; GLASZMANN J.C.; D'HONT, A. A putative major gene for rust resistance linked with an RFLP marker in sugarcane cultivar R570. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.92, p.1059-1064, 1996.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMAN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J. C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics*, v. 250, n. 4, p 405-413, 1996.

DOYLE, J.J. AND DOYLE, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, London, v.3, p. 278-84, 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3º ED. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998

DOS SANTOS, A. DA S. Doenças causadas por fungos. In. DINARDO-MIRANDA, L.L.; DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.C.A. (Eds). *Cana-de-açúcar*. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. cap. 19, p. 423-435.

GARCIA, E. O.; CASAGRANDE, M. V.; RAGO, A. M.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana de açúcar. *SummaPhytopathologica*, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 152-156, 2007.

GIGLIOTI, E. A.; CANTERI, M. G.; FRANÇA, J. A.; CARDIM, M.; DEL PONTE, E. M.; ABI SAAD, O. Informações básica para o monitoramento, diagnóstico e manejo da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. *Boletim técnico SCORALERT*, Adamantina, v. 25, n 1, p. 1-6, 2009.

GOES, T.; ARAÚJO, M.; MARRA, R. Novas fronteiras tecnológicas da cana-de-açúcar no Brasil. *Revista de política agrícola*, Brasília, Ano XVIII, n. 1, p. 50-59, jan./fev./mar. 2009.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology*, Amsterdam, v.5, p.122-127, 2001.

GLYNN, N.C.; COMSTOCK, J.C.; McCorkle, K. Screening for Resistance to Brown Rust of Sugarcane: Use of Bru1 resistance gene prospects and challenges. *Journal American Society of Sugar Cane Technologists*, Belle Glade, v. 32, p. 82, 2012.

GUR-ARIE, R. et al. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *GenomeResearch*, v. 10, p. 62-71, 2000.

HOGARTH, D.M.; RYAN, C.C.; TAYLOR, P.W.J. Quantitative inheritance of rust resistance in sugar cane. *Field Crops Research*, Philadelphia, v.34, n.2, p.187-193, 1993.

IDO, O. T.; LIMA-NETO, V. C.; DAROS, E.; POSSAMAI, J. C.; ZAMBON, H. W.; OLIVEIRA, R. A. Incidência e severidade da ferrugem em clones de cana-de-açúcar no estado do Paraná. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Brasil, v. 36, n. 2, p. 159-163, 2006.

KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, v. 177, p. 309-334, 2011.

KLOSOWSKI, A. C.; RUARO, L.; BESPALHOK FILHO, J. C.; MIO, L. L. M. Proposta e avaliação de escala para a ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. *Tropical PlantPathology*, Brasil, v. 38, n. 5, p. 166-171, 2013.

LABORD, C. M. Sugarcane tasseling under artificial photoperiod conditions as affected by nitrogen rate and temperature. 2007. 76f. (Tese de doutorado em Fisiologia de Plantas). The School of Plant, Environmental, and Soil Sciences, Louisiana.

LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). *Cana-de-açúcar*. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 101-156.

Le CUNFF L, GARSMEUR O, RABOIN LM, PAUQUET J, TELISMART H, SELVI; A, GRIVET L, PHILIPPE R, BEGUM D, DEU M, COSTET L, Wing R, GLASZMANN JC, D'HONT A. Diploid/polyploidsyntenic shuttle mapping and haplotype-specific chromosome walking toward a rust resistance gene (*Bru1*) in highly polyploidy sugarcane ($2n \sim 12x \sim 115$). *Genetics*. Bethesda, v.180, p.649–660, 2008.

MACCHERONI, W.; JORDÃO, H.; DE GASPARI, R.; MOURA, G. L.; MATSUOKA, S. Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane. *Sugar cane International* [s.l.], v.27, n.2, p. 8-13, 2009.

MACCHERONI, W.; JORDÃO, H.; DE GASPARI, R.; MOURA, G. L.; MATSUOKA, S. Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane. *Sugar cane International* [s.l.], v.27, n.2, p. 8-13, 2009.

MAGAREY, R.; SMITH, G.R. McINTYRE, C.L.; WHAN, V.A.; CROFT, B.; Identification and Validation of Molecular Markers Associated with *Pachymetra* Root Rot and Brown Rust Resistance in Sugarcane Using Map-and Association-based

Approaches. Molecular Breeding, Dordrecht, v.16, p.151-161, 2005b.

MATSUOKA, S.; MACCHERONI, W. Manejo de Doenças. In. SANTOS, F.; BOREM, A.; CALDAS, C. (Eds). Cana-de-açúcar. Bioenergia, Açúcar e Alcool – Tecnologias e Perspectivas. Viçosa: UFV, 2010, p. 161-180.

MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; MASUDA, Y. Variedades de cana: minimizando riscos na adoção. Revista STAB, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 18-19, 1999.

MOURA, G. L; GHELLER, A. C. A; MATSUOKA, S. and GIGLIOTI, E. A. The impact of rust (*P. melanocephala*) on sugarcane production in the state of São Paulo. In: XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Curitiba, Brasil. Anais...Fitopatologia Brasileira 24 (supl), 1999, p.279.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, p.175-182, 1993.

MUKHERJEE, S.K. Origin and distribution of *Saccharum*. Botanical Gazette, Chicago, v. 119, p. 55–61, 1957.

NEUBER, A.C. Survey of the *Bru1* gene for brown rust resistance in Brazilian local and basic sugarcane germplasm. Plant Breeding, v.136, p. 182-187, 2017

NEVES, M. F.; CONEJERO, M. A. Estratégias da indústria da cana. In: _____. (Ed.) Estratégias para a cana no Brasil: um negócio classe mundial. São Paulo: Atlas, 2010, p. 59-88.

PALHARES, A. C.; RODRIGUES-MORAIS, T. B.; SLUYS, M.-A. VAN; DOMINGUES, D.S.; MACCHERONI, W.; JORDÃO, H.; SOUZA, A.P.; MARCONI, T.G.; MOLLINARI, M.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A.A.F.; VIEIRA, M.L.C. A novel linkage map of sugarcane with evidence for clustering of retrotransposon-based markers. BMC genetics, London, v. 13, p. 51, 2012.

PARK, J.W.; SOLIS-GRACIA, N.; TREVINO, C.; SILVA, J.A. Exploitation of conserved intron scanning as a tool for molecular marker development in the *Saccharum* complex. Molecular Breeding, Dordrecht, v.30, n.2, p.987-999, 2012.

PARCO, A. S.; AVELLANEDA, M. C.; HALE, A. H.; HOY, J. W.; KIMBENG, C. A.; PONTIF, M. J.; GRAVOIS, K. A.; BAISAKH, N. Frequency and distribution of the brown rust resistance gene *Bru1* and implications for the Louisiana sugarcane breeding programme. Plant Breeding, Berlin, v. 3, n. 4, p. 1-6, 2014.

PARIDA, S.K.; KALIA, S.K.; KAUL, S.; DALAL, V.; HEMAPRABHA, G.; SELVI, A.; PANDIT, A.; SINGH, A. GAIKWAD, K.; SHAMA, T.R.; SIRVASTAVA, P.S.; SINGH, N.K.; MOHAPATRA, T. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. Theoretical and Applied Genetics, v. 118, p. 327-338, 2009.

PANJE, R.R.; SRINIVASAN, K. Studies in *Saccharum spontaneum*. The geographical

distribution of spikelet length. Indian Journal of Sugarcane Research & Development, Nova Dehli, v.1, p.1-8, 1957.

PANJE, R.R.; BABU, C. Studies in *Saccharum spontaneum*. Distribution and geographical association of chromosome numbers. Cytologia, Tokyo, v.25, p.152-172, 1960.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Armando Bergamin Filho; Hiroshi Kimati; Lilian Amorim. (Eds.). Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos. 3ed. São Paulo, SP: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1995, v. 1, p. 417-453.

PIPERIDIS, N.; JACKSON, P.A.; D'HONT, A.; BESSE, P.; HOARAU, J.Y.; COURTOIS, B.; AITKEN, K.S.; McINTYRE, C.L. Comparative genetics in sugarcane enables structured map enhancement and validation of marker-trait associations. Molecular Breeding, Berlin, v. 21, p. 233-247, 2008.

PRICE, S. Cytogenetics of modern sugar canes. **Economic botany**, v.17, p.97-105, 1963.

PRIESTLY, R. Detection of increased virulence in populations of wheat yellow rust. In: Scott Pr, bainbridge a (Eds) Plant Disease Epidemiology. Oxford: Blackwell scientific, 1978. p. 63-70.

PURDY, L.H.; LIU, L.; DEAN, J.L. Sugarcane rust, a newly important disease. Plant Disease, Saint Paul, v.69, p.1292-1296, 1983.

RABOIN LM, SELVI A, NIBOUCHE S, MIRANDA OLIVEIRA K, PAUQUET J, CALATAYUDC, ZAPATER M, GARSMEUR O, TELISMART H, DINTINGER J, HOARAU JH, COSTET L, CARLIER J, D'HONT A (2006) Genetic of sugarcane resistance to smut (*Ustilago scitaminea*): characterisation of pathogen diversity, QTL mapping in a bi-parental progeny and associations study among modern cultivars. In 'Vth ISSCT Molecular Biology Workshop'. Réduit, Mauritius, 3-7 April 2006.

RACEDO, J.; PERERA, M.F.; BERTANI, R.; FUNES, C.; GONZÁLEZ, V.; CUENYA, M.I.; D'HONT, A.; BJORN, W.; CASTAGNARO, A.P. Br1 gene and potential alternative sources of resistance to sugarcane brown rust disease. Euphytica, Wageningen, v.191, n. 4, p. 429-436, 2013.

RALOFF, J. ILL Winds - drust storms ferry toxic agents between countries and even continents: sugarcane rust. Science News, Washington, v.160, n.14, p.218, 2001.

RAMDOYAL, K.; SULLIVAN, S.; MEDAN, H.; BADALOO, G.; SAUMTALLY, S.; DOMAINGUE, R. Trends in the inheritance of rust (*Puccinia melanocephala* H. and P. Syd) in sugar cane. Sugar Cane, Kent, v.3, p.19-23, 1996.

RAID, R.N., COMSTOCK, J.C., in: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SAUMTALLY, A.S. In: A guide to sugarcane disease. Ed. Repères. 2000. 343 p.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO (RIDESA). **Liberção nacional de novas variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba, 2010. 64 p.

RYAN, C.C.; EGAN, B.T. Rust. RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE JUNIOR, A.G.; HUGHES, C.G. In: Diseases of sugarcane. ed. Amsterdam: Elsevier, 1989. p.189-210.

RIPOLI, M. L. C.; RIPOLI, T. C. C. Palhiço como fonte de energia. In: DINARDOMIRANDA, L. L.; VASCONCELOS; A. C. M.; LANDELL; M. A. G. Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p.791-806.

RUST DISEASE ON SUGARCANE. Disponível em https://www.vsisugar.com/india/agriculture_divisions/plantpathology/rustdisease-sugarcane.htm. Acesso em 21/09/2016

SACIOTO, R.F.Z. Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala*. 2003. 86f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SANGUINO, A.; TOLEDO, A. C. D. Considerações sobre a ferrugem da cana-de-açúcar. Boletim técnico Copersucar, São Paulo, v. 22, p. 25-31, 1983.

SANTOS, A.S. Doenças causadas por fungos. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; LANDELL, M.G.A.; VASCONCELOS, A.C.M. (Ed.). Cana-de-açúcar. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p.423-435.

SHINE, J.M.; COMSTOCK, J.C.; DEAN, J.L. Comparison of five isolates of sugarcane rust and differential reaction on six sugarcane clones. In: International Society Of Sugar Cane Technologists Congress, 2005, Guatemala. Proceedings. Guatemala: ISSCT, 2005. v.1, p.638-647.

SILVA, M. B.; MORAIS, A. S. Avaliação energética do bagaço de cana em diferentes níveis de umidade e graus de compactação. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO - A integração de cadeias produtivas com a abordagem da manufatura sustentável, 28., 2008, Rio de Janeiro. Resumos... Rio de Janeiro: ABEPRO, 2008. p. 9.

SIMCOX, K.D.; BENNETZEN, J.L. The use of molecular markers to study *Setosphaeria turcica* resistance in maize. **Phytopathology**, v. 83, n.12, p.1326-1330, 1993.

SOOD, S. G.; COMSTOCK, J. C.; GLYNN, N. C. Leaf whorl inoculation method for screening sugarcane rust resistance. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 93, n. 12, p. 1335-1340, 2009.

SORDI, R. A.; MATSUOKA, S.; MASUDA, Y.; AGUILLERA, M. M. Sugarcane rust: a new problem in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasil, v. 13, n. 4, p. 313-316, 1988.

STEVENSON, G.C. Genetics and Breeding of Sugarcane. Tropical Science Series. ed. London: Longmans, Green and Co Ltd., 1965. 284p.

TAI, P.Y.P.; MILLER, J.D.; DEAN, J.L.; Inheritance of resistance to rust in sugarcane. *Field Crops Research*, Philadelphia, v.4, p.261-268, 1981.

TAI, P.Y.P.; DEAN, J.L.; MILLER, J.D. Effect of selection for agronomic performance on frequency of rust susceptibility in sugarcane. (1984) Ed. BEARDSLEY, D.L.; CLAYTON, J.E.; MARTIN, F.A. In: *American Society of Sugar Cane Technologists*, p. 22-27.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed). *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap. 21, p. 185-196.

TRUDGILL 1991 Resistance to and Tolerance of Plant Parasitic Nematodes in Plants *Annual Review of Phytopathology* Vol. 29:167-192 (Volume publication date September 1991).

THODAY, J.M. Location of polygenes. *Nature*, v.191, p.368-370, 1961.

VAN DER VOORT, J.N.A.M.; VAN ECK, H.J.; VAN ZANDVOORT, P.M.; OVERMARS, H.; HELDER, J.; BAKKER, J. Linkage analysis by genotyping of sibling populations: a genetic map for the potato cyst nematode constructed using a “pseudo-F2” mapping strategy. *Molecular and General Genetics*, v.261, n.6, p.1021-1031, 1999.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, v.23, n.1, p.47-55, 2005.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. Genética biométrica no fitomelhoramento. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 13, n. 7, p. 496, 1992.

XU, M.L., MELCHINGER, A.E., XIA, X.C.; LUBBERSTEDT, T. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR and AFLP markers. *Molecular and General Genetics*, v.261, n.3, p.574-581, 1999. WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, v. 7, p. 524-530, 1990.

ZABEAU, M.; VOS, P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. Publication 0534858A1. Munich, Germany: European Patent Office 92402629, 1993

ZATTI, F.B.; BALSALOBRE, T.W.A. CHAPOLA, R.G.; HOFFMANN, H.P.; CARNEIRO, M.S. Validação de marcadores moleculares associados à resistência à

ferrugem marrom em cana-de-açúcar. Summa Phytopathologica, v.43, n.1, p.36-40, 2017.